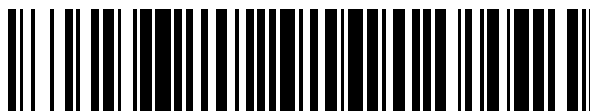


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 141**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/435** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.11.2011 PCT/EP2011/070907**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2012 WO12069572**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2011 E 11787875 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 2643346**

54 Título: **Modulación de inmunogenicidad antigénica mediante la adición de epítomos reconocidos por linfocitos T citolíticos naturales**

30 Prioridad:

**25.11.2010 EP 10192564**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**08.11.2018**

73 Titular/es:

**IMNATE SARL (100.0%)  
80 Rue des Romains  
8041 Strassen, LU**

72 Inventor/es:

**SAINT-REMY, JEAN-MARIE**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 689 141 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Modulación de inmunogenicidad antigénica mediante la adición de epítomos reconocidos por linfocitos T citolíticos naturales

5

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a péptidos o polipéptidos con capacidad para reclutar y activar linfocitos T citolíticos naturales y a su uso en el tratamiento de infecciones con tumores u organismos intracelulares, y la prevención de enfermedades mediante estrategias de vacunación.

10

**Antecedentes de la invención**

Las enfermedades infecciosas crónicas debidas a patógenos intracelulares son difíciles de tratar porque las células infectadas reducen la expresión en superficie de varias moléculas que permitirían normalmente que el sistema inmunitario reconozca específicamente dichas células infectadas. Ejemplos son infecciones por micobacterias en las que las células infectadas inhiben la expresión de moléculas de los complejos mayores de histocompatibilidad (CMH) impidiendo de ese modo el reconocimiento por linfocitos T del linaje CD8 (mediante reconocimiento de CMH de clase I) y por linfocitos del linaje CD4 (mediante reconocimiento de CMH de clase II). De hecho, muchas bacterias y virus tienen métodos elaborados para escapar al reconocimiento de células infectadas.

15

20

En cierta medida, los mismos mecanismos permiten que los tumores escapen a la detección. Unos pocos de tales tumores expresan determinantes de CMH de clase II al menos en condiciones inflamatorias. Algunos experimentos recientes han mostrado que incluso cuando se aumentó el reconocimiento de CD8 de péptidos derivados de tumor presentados en CMH de clase I, por ejemplo, mediante vacunación, el efecto global sobre el crecimiento tumoral sigue siendo limitado.

25

Tanto en la infección crónica con patógenos intracelulares como en tumores, existe la necesidad urgente de nuevos métodos elaborados mediante los que se reconocieran y eliminaran células infectadas o tumorales, respectivamente.

30

La vacunación para enfermedades infecciosas es práctica habitual. Aunque, en un número significativo de estados, la eficacia de la vacunación está limitada por la inducción preferente de anticuerpos específicos frente a los patógenos y escasa o ninguna estimulación de células inmunitarias que reconocerían las células infectadas. Por tanto, la prevención de enfermedades virales y bacterianas mediante vacunación es a menudo de eficacia limitada. Se encuentran ejemplos en la eficacia de varias vacunas para enfermedades virales, tales como virus influenza, rotavirus o incluso poliovirus al menos en algunas zonas del mundo. En algunos casos, los antígenos considerados para la vacunación son inmunógenos débiles y, debido a la gran diversidad de determinantes de CMH, se observa una variación significativa en la eficacia de un sujeto a otro.

35

La vacunación para enfermedades alérgicas también presenta limitaciones relacionadas o bien con la débil inmunogenicidad de alérgenos o bien a la falta de control de riesgos relacionados con la administración de un alérgeno a un sujeto que es propenso a reaccionar con síntomas alérgicos.

40

En ambas vacunaciones frente a agentes infecciosos y frente a alérgenos existe la necesidad de métodos más eficientes y más seguros.

45

Los linfocitos T citolíticos naturales (NKT) constituyen un linaje diferenciado de linfocitos T no convencionales que reconocen antígenos presentados por la molécula CD1d de complejo CMH de tipo no clásico. Actualmente se describen dos subconjuntos de linfocitos T citolíticos naturales. Los linfocitos T citolíticos naturales de tipo 1, también denominados linfocitos T citolíticos naturales invariantes (iNKT), son los más abundantes. Se caracterizan por la presencia de un receptor de célula T alfa-beta (TCR) compuesto por una cadena alfa invariante, Valpha14 en el ratón y Valpha24 en seres humanos. Esta cadena alfa se asocia con un número variable aunque limitado de cadenas beta. Los linfocitos T citolíticos naturales de tipo 2 tiene un TCR alfa-beta pero con una cadena alfa polimórfica. Sin embargo, resulta evidente que existen otros subconjuntos de linfocitos T citolíticos naturales, cuyo fenotipo está todavía definido de manera incompleta, pero que comparten las características de activarse por glicolípidos presentados en el contexto de la molécula CD1d.

50

55

Los linfocitos T citolíticos naturales expresan normalmente una combinación de receptor de linfocito citolítico natural (NK), incluyendo NKG2D y NK1.1. Los linfocitos T citolíticos naturales forman parte del sistema inmunitario innato, que puede distinguirse del sistema inmunitario adaptativo por el hecho de que no requieren expansión antes de adquirir una capacidad efectora completa. La activación de linfocitos T citolíticos naturales da como resultado diversos efectos. Tales células liberan mediadores formados previamente, incluyendo una gran serie de citocinas (incluyendo IL-4, IFN-gamma, IL-21 e IFN-alfa) que proporcionan ayuda a las células B para la producción de anticuerpos y se ha sugerido que la liberación de citocinas también podría influir en las células T CD4+ (Burrows *et al* Nature Immunology 2009, 10: 669-671). En el contexto de la presente invención, serían beneficiosas la activación de células B y la activación de células T CD4+ restringida por complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase

60

65

II.

5 La unidad de reconocimiento para linfocitos T citolíticos naturales, la molécula CD1d, tiene una estructura que se asemeja estrechamente a la de la molécula de CMH de clase I, incluyendo la presencia de beta-2-microglobulina. Se caracteriza por una profunda hendidura bordeada por dos cadenas alfa y que contienen residuos altamente hidrófobos, que acepta cadenas lipídicas. La hendidura está abierta en ambos extremos, permitiendo que alberguen cadenas más largas. El ligando canónico para CD1d es la alfa-galactosilceramida sintética (alfa-GalCer). Sin embargo, se han descrito muchos ligandos naturales alternativos, incluyendo glico y fosfolípidos, el lípido natural sulfátido que se encuentra en la mielina, el fosfoinositol microbiano manósido y alfa-glucuronosilceramida. El consenso actual (véanse revisiones, tales como Matsuda *et al*, Current Opinion in Immunology 2008, 20:358-368 y Godfrey *et al*, Nature reviews Immunology 2010, 11: 197-206) es que CD1d se une únicamente a ligandos que contienen cadenas lipídicas, o en general una estructura común compuesta por una cola lipídica que está enterrada en CD1d y un grupo de cabeza de residuo polar que sobresale de CD1d.

15 No se considera que los péptidos puedan activar linfocitos T citolíticos naturales a través de presentación por CD1d. Sin embargo, se sugirió que péptidos hidrófobos largos que contienen residuos de aminoácido voluminosos que podrían unirse a CD1d (Castano *et al*, Science 1995, 269: 223-226). Las observaciones llevadas a cabo usando bibliotecas de presentación en fago que expresan péptidos de secuencia aleatoria sin relevante fisiológica definida, permitieron establecer un motivo consenso teórico (Castano *et al*, Science 1995, 269: 223-226 y véase a continuación). De hecho, Castano *et al* muestran que las células que se activan son células T CD8+, concretamente células restringidas por CMH clase I, y no linfocitos T citolíticos naturales. Estos hallazgos enseñan al experto en la técnica que no hay evidencias de que los péptidos hidrófobos se presenten por moléculas CD1d. La relevancia fisiológica de las reivindicaciones realizadas por Castano *et al* se cuestionó adicionalmente debido a la incapacidad para estimular linfocitos T citolíticos naturales en protocolos de inmunización convencionales (Matsuda *et al*, Current Opinion in Immunology 2008, 20:358-368 y Brutkiewicz Journal of Immunology 2006, 177: 769-775). Sistemas artificiales tales como inmunización con células transfectadas para sobreexpresar CD1d y cargarse *in vitro* con un péptido derivado de ovoalbúmina pudieron estimular linfocitos T citolíticos naturales. Asimismo, la inmunización intradérmica con ADN de plásmido junto con CD1d murina y moléculas coestimuladoras inducen células T restringidas por CD1d citolítica (Lee *et al*, Journal of Experimental Medicine 1998, 187: 433-438). Castano *et al* (Science 269: 223, 1995) reivindicaron que los péptidos hidrófobos que contienen un motivo estructural compuesto por un residuo aromático en las posiciones P1 y P7, y una cadena alifática en la posición P4 contienen un motivo central para los epítomos de unión a CD1d. Tal como se describió anteriormente, las conclusiones a las que llegaron Castano *et al* no están respaldadas por los datos. El documento WO 2010/037402 da a conocer métodos para construcción de componentes de vacuna caracterizados por su dominio de multimerización y las moléculas biológicamente activas unidas.

El documento WO 2010/037395 da a conocer complejos de CMH-péptido y usos de los mismos en el diagnóstico de, tratamiento de o vacunación frente a una enfermedad en un individuo.

40 Las secuencias identificadas por Castano pueden estar presentes de manera natural en los péptidos de estas dos publicaciones. Se realizó el hallazgo inesperado de que los péptidos que engloban una secuencia de aminoácidos hidrófobos pueden estimular, de hecho, la activación de linfocitos T citolíticos naturales a través de presentación por CD1d.

45 Adicionalmente, la activación de linfocitos T citolíticos naturales proporciona un modo de aumentar la eficiencia de vacunas frente a enfermedades infecciosas y frente a alérgenos, debido a las grandes cantidades de citocinas secretadas por linfocitos T citolíticos naturales que ayudan en la estimulación de células B y la activación de células T restringidas a clase II (Burrows *et al* Nature Immunology 2009, 10: 669-671) y de ese modo la producción de anticuerpos.

50 Si pudieran unirse epítomos de proteínas a CD1d, entonces la adición de un motivo de unión a CD1d a una proteína podría aumentar la activación de linfocitos T citolíticos naturales, lo que podría dar como resultado o bien la inducción de la destrucción de células presentadoras de antígeno, tal como sería apropiado para el tratamiento de infecciones con patógenos intracelulares o de tumores, o bien el aumento de la inmunogenicidad de antígenos, tal como sería apropiado en estrategias de la vacunación para enfermedades infecciosas o alergia.

55 Las ejemplos de infección con patógenos intracelulares incluyen infecciones por micobacterias, infección bacteriana intracelular, enfermedades virales e infecciones parasitarias. Ejemplos de tumores son cualquier tumor que exprese CD1d. Ejemplos de antígenos usados para vacunación son proteínas virales usadas en la vacunación contra la gripe, vacunación con rotavirus orales o poliovirus orales y vacunación con alérgenos.

60 Más específicamente, la adición de un motivo de unión a CD1d sería útil cuando se desea aumentar la actividad de destrucción de linfocitos T citolíticos naturales hacia células presentadoras de antígeno, o aumentar la producción de citocinas producidas por linfocitos T citolíticos naturales y aumentar de ese modo la inmunogenicidad.

65 La generación de nuevo(s) motivo(s) de unión a CD1d dentro de la secuencia natural de péptidos o polipéptidos, o la

adición de motivo(s) de unión a CD1d a tales péptidos o polipéptidos para reclutar y activar linfocitos T citolíticos naturales forma la base de la presente invención.

**Sumario de la invención**

5 La presente invención es tal como se define en las reivindicaciones y se refiere al uso de péptidos o polipéptidos modificados que pueden activar linfocitos T citolíticos naturales para el tratamiento de infecciones con patógenos intracelulares en un sujeto aumentando la eliminación de células que portan tales patógenos.

10 La presente invención también se refiere al uso de péptidos o polipéptidos modificados que pueden activar linfocitos T citolíticos naturales para la terapia de tumores en un sujeto aumentando el reconocimiento y la destrucción de células tumorales.

15 La presente invención también se refiere al uso de péptidos o polipéptidos modificados que pueden activar linfocitos T citolíticos naturales con fines de vacunación en un sujeto con antígenos procedentes de agentes infecciosos o alérgenos.

20 Se realizó la observación inesperada de que pueden presentarse péptidos por moléculas CD1d y activar linfocitos T citolíticos naturales. La activación de tales células da como resultado la adquisición de propiedades citolíticas contra la presentación a células del péptido unido a CD1d y en la liberación de citocinas.

25 La presente invención se refiere en un aspecto al uso de al menos un péptido o polipéptido inmunogénico aislado derivado de un patógeno intracelular, que se modifica mediante la generación de al menos un motivo de unión a CD1d dentro de la secuencia natural de dicho péptido o polipéptido, o mediante la adición de al menos un motivo de unión a CD1d a dicho péptido o polipéptido como medicamento para tratar en un sujeto la infección con dicho patógeno intracelular.

30 La presente invención también se refiere en un aspecto al uso de al menos un péptido o polipéptido inmunogénico aislado derivado de un tumor, que se modifica mediante la generación de al menos un nuevo motivo de unión a CD1d dentro de la secuencia natural de dicho péptido o polipéptido, o mediante la adición de al menos un motivo de unión a CD1d a dicho péptido o polipéptido como medicamento para tratar en un sujeto dicho tumor.

35 La presente invención también se refiere en un aspecto al uso de al menos un péptido o polipéptido inmunogénico aislado derivado de un agente infeccioso extracelular, que se modifica mediante la generación de al menos un nuevo motivo de unión a CD1d dentro de la secuencia natural de dicho péptido o polipéptido, o mediante la adición de al menos un motivo de unión a CD1d a dicho péptido o polipéptido como medicamento para la prevención en un sujeto de dicha infección.

40 La presente invención también se refiere en un aspecto al uso de al menos un péptido o polipéptido inmunogénico aislado derivado de un alérgeno, que se modifica mediante la generación de al menos un nuevo motivo de unión a CD1d dentro de la secuencia natural de dicho péptido o polipéptido, o mediante la adición de al menos un motivo de unión a CD1d a dicho péptido o polipéptido como medicamento para prevenir en un sujeto reacciones alérgicas.

45 Debe quedar claro para el experto en la técnica que la generación de un motivo de unión a CD1d, en cualquiera de las indicaciones enumeradas anteriormente, implica que dicho motivo, cuando se presenta por la molécula CD1d expresada por una célula presentadora de antígeno, se reconoce por linfocitos T citolíticos naturales y activa dichos linfocitos T citolíticos naturales.

50 En un aspecto adicional, la invención también cubre el uso de al menos un derivado de péptido o polipéptido aislado de un patógeno intracelular, un tumor, un agente infeccioso o un alérgeno, que se modifica mediante la generación de al menos un nuevo motivo de unión a CD1d dentro de la secuencia natural de dicho péptido o polipéptido, o mediante la adición de al menos un motivo de unión a CD1d a dicho péptido o polipéptido para reclutar y activar linfocitos T citolíticos naturales, como medicamento para activar en un sujeto la actividad citolítica y la producción de citocinas por linfocitos T citolíticos naturales CD4+ en dicho sujeto.

55 En cualquiera de los usos anteriores dicho péptido o polipéptido derivado de un patógeno intracelular puede ser cualquier péptido o polipéptido derivado de virus, bacterias, micobacterias o parásitos con un ciclo de vida intracelular. Los virus incluyen virus de ADNmc, ADNbc y ARN, como ejemplos con los virus *Herpesviridae*, *Flaviviridae* y *Picornaviridae*, influenza, de sarampión y de inmunodeficiencia. Las bacterias y micobacterias incluyen *Mycobacterium tuberculosis*, otras micobacterias patógenas para seres humanos o animales, *Yersiniosis*, *Brucella*, *Chlamydiae*, *Mycoplasma*, *Rickettsiae*, *Salmonellae* y *Shigellae*. Los parásitos incluyen *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Toxoplasma gondii*, *Listeria*, *Histoplasma*.

65 En cualquiera de los usos anteriores dicho péptido o polipéptido derivado de un tumor puede ser cualquier péptido o polipéptido derivado de: (1) oncogenes, tales como el MAGE identificado en algunos melanomas; (2) protooncogenes, tales como ciclina D1 expresada en carcinomas de tejidos blandos tales como los del riñón o la

glándula paratiroidea, así como en mieloma múltiple; (3) proteínas derivadas de virus, tales como las procedentes del virus de Epstein-Barr en algunos carcinomas y en algunos linfomas de tipo Hodgkin; (4) factores de supervivencia, que son factores antiapoptóticos tales como survivina o bcl2; (5) determinantes clonotípicos, tales como determinantes idiotípicos derivados de receptor de células B en linfomas foliculares o mielomas múltiples o determinantes de receptor de células T en tumores malignos de células T.

En cualquiera de los usos anteriores dicho péptido o polipéptido se derivó de un agente infeccioso, incluyendo virus, bacterias y parásitos.

En cualquiera de los usos anteriores dicho péptido o polipéptido derivado de un alérgeno puede ser cualquier péptido o polipéptido derivado de

- alérgenos alimentarios presentes en cacahuetes, pescado por ejemplo bacalao, clara de huevo, crustáceos por ejemplo gambas, leche por ejemplo leche de vaca, trigo, cereales, frutas de la familia *Rosacea* (manzana, ciruela, fresa), verduras de las familias *Liliacea*, *Cruciferae*, *Solanaceae* y *Umbelliferae*, frutos secos, sésamo, cacahuete, soja y otros alérgenos de la familia de las legumbres, especias, melón, aguacate, mango, higo, plátano, ....

- alérgenos de ácaros domésticos obtenidos de *Dermatophagoides spp* o *D. pteronyssinus*, *D. farinae* y *D. microceras*, *Euroglyphus maynei* o *Blomia sp.*,

- alérgenos de insectos presentes en cucarachas o *Hymenoptera*,

- alérgenos del polen, especialmente pólenes de árboles, hierbas y malas hierbas,

- alérgenos de animales, especialmente en gatos, perros, caballos y roedores,

- alérgenos de hongos, especialmente de *Aspergillus*, *Alternaria* o *Cladosporium*, y

- alérgenos laborales presentes en productos tales como látex o amilasa.

La invención engloba además vectores virales aislados caracterizados porque comprenden al menos un péptido o polipéptido derivado de un patógeno intracelular, de un tumor, de un agente infeccioso o de un alérgeno en el que se genera al menos un nuevo motivo de unión a CD1d dentro de la secuencia natural de dicho péptido o polipéptido, o en el que se añade al menos un motivo de unión a CD1d.

### Definiciones

El término "péptido" cuando se usa en el presente documento se refiere a una molécula que comprende una secuencia de aminoácidos de entre 2 y 200 aminoácidos, conectada mediante enlaces peptídicos, pero que puede comprender en una realización particular estructuras sin aminoácidos (como, por ejemplo, un compuesto orgánico de enlace). Los péptidos según la invención pueden contener cualquiera de los 20 aminoácidos convencionales o versiones modificadas de los mismos, o pueden contener aminoácidos que no se producen de manera natural incorporados mediante síntesis peptídica química o mediante modificación química o enzimática. El término "polipéptido" cuando se usa en el presente documento se refiere generalmente a proteínas o péptidos más largos.

El término "epítipo" cuando se usa en el presente documento se refiere a una o varias porciones (que pueden definir un epítipo conformacional) de una proteína que se reconoce(n) específicamente y se une(n) mediante un anticuerpo o una porción del mismo (Fab', Fab2', etc.) o un receptor presentado en la superficie celular de un linfocito de célula B o T, y que puede inducir, mediante dicha unión, una respuesta inmunitaria.

El término "antígeno" cuando se usa en el presente documento se refiere a una estructura de una macromolécula que comprende uno o más hapteno(s) y/o que comprende uno o más epítipos de células T. Normalmente, dicha macromolécula es una proteína o un péptido (con o sin polisacáridos) o se produce a partir de una composición proteica y comprende uno o más epítipos; dicho macromolécula puede denominarse alternativamente en el presente documento "proteína antigénica" o "péptido antigénico".

El término "alérgeno" se refiere a un subconjunto específico de antígenos caracterizados por su capacidad para estimular anticuerpos del isotipo IgE en individuos predispuestos.

El término "epítipo de célula T" o "epítipo de células T" en el contexto de la presente invención se refiere a un epítipo dominante, subdominante o menor de células T, es decir, una parte de una proteína antigénica que se reconoce y se une específicamente por un receptor en la superficie celular de un linfocito T. El que un epítipo sea dominante, subdominante o menor depende de la reacción inmunitaria estimulada frente al epítipo. La dominancia depende de la frecuencia a la que se reconocen tales epítipos por células T y que puede activarlos, entre todos los

posibles epítomos de célula T de una proteína. En particular, un epítomo de célula T es un epítomo unido por moléculas de CMH de clase I o CMH de clase II.

5 El término “epítomo de linfocitos T citolíticos naturales” se refiere a una parte de una proteína antigénica que se reconoce y se une específicamente por un receptor en la superficie celular de un linfocito T. En particular, un epítomo de linfocitos T citolíticos naturales es un epítomo unido por moléculas CD1d.

10 El término “células efectoras CD4+” se refiere a células pertenecientes al subconjunto positivo para CD4 de células T cuya función es proporcionar ayuda a otras células, tales como, por ejemplo células B. Estas células efectoras se notifican convencionalmente como células Th (para *T helper cells*, células T cooperadoras), con diferentes subconjuntos tales como células Th0, Th1, Th2 y Th17.

15 El término “linfocitos T citolíticos naturales” se refiere a células del sistema inmunitario innato caracterizadas por el hecho de que portan receptores tales como NK1.1 y NKG2D, y reconocen epítomos presentados por la molécula CD1d. En el contexto de la presente invención, los linfocitos T citolíticos naturales pueden pertenecer a cualquiera del subconjunto de tipo 1 (invariante) o de tipo 2.

20 La “molécula CD1d” se refiere a una molécula no derivada de CMH compuesta por 3 cadenas alfa y un conjunto antiparalelo de cadenas beta dispuestas en un surco hidrófobo profundo abierto en ambos lados y que puede presentar lípidos, glicolípidos o péptidos hidrófobos a linfocitos T citolíticos naturales.

25 El término “motivo de unión a CD1d” se refiere a una secuencia de aminoácidos que corresponde al motivo de aminoácidos general [FW]-XX-[ILMV]-XX-[FW], en el que F representa fenilalanina, W triptófano, I isoleucina, L leucina, M metionina y V valina. X representa cualquier aminoácido. En algunos casos, [FW] en la posición 7 se reemplaza por T (treonina) o H (histidina).

30 El término “supuesto motivo de unión a CD1d” cuando se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de aminoácidos que corresponde al motivo de aminoácidos general [FWHY]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-[ILMV] o [ILMV]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-[FWHY] en el que Y representa tirosina. En algunos casos, el supuesto motivo puede ser [FWHY]-X<sub>2</sub>-[ILMV] o [ILMV]-X<sub>2</sub>-[FWHY] o [FWHY]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-[ILMV] o [ILMV]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-[FWHY].

35 El término “trastornos inmunitarios” o “enfermedades inmunitarias” se refiere a enfermedades en las que una reacción del sistema inmunitario es responsable de o sostiene un mal funcionamiento de una situación no fisiológica en un organismo. Trastornos inmunitarios en el contexto de la presente invención se refieren a una patología inducida por agentes infecciosos y vigilancia tumoral.

El término “sujeto” se refiere a mamíferos incluyendo primates y no primates.

#### 40 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona modos para suprimir o eliminar, en un sujeto, una infección con un patógeno intracelular o un tumor, o aumentar la inmunogenicidad de antígenos tales como algunos agentes infecciosos y alérgenos usados para estrategias de vacunación.

45 En particular, la invención proporciona modos para aumentar la expansión y actividad funcional de linfocitos T citolíticos naturales CD4+. Tales células se clasifican habitualmente en dos subconjuntos diferenciados, concretamente tipo 1 para linfocitos T citolíticos naturales que portan una cadena alfa de TCR invariante (Valfa14 en el ratón, Valfa24 en seres humanos), o linfocitos T citolíticos naturales de tipo 2 que se presentan con un repertorio de cadenas alfa diversas. Sin embargo, algunas evidencias recientes han sugerido que subconjuntos alternativos de linfocitos T citolíticos naturales que no encajan ni en la categoría de tipo 1 ni en la de tipo 2. El propósito de la invención es incluir estos linfocitos T citolíticos naturales no convencionales, siempre que porten el correceptor CD4. Tras la presentación de un antígeno unido a CD1d, se activan rápidamente linfocitos T citolíticos naturales, adquieren propiedades citolíticas y secretan varias citocinas que se cree que son determinantes en la influencia sobre otras células a partir de ambos sistemas inmunitarios innato y adaptativo.

55 En el contexto de la presente invención, se realizó la observación inesperada de que pueden presentarse péptidos por la molécula CD1d y pueden activar linfocitos T citolíticos naturales que reconocen el complejo producido entre CD1d y el péptido. Una característica de la molécula CD1d es que está compuesta por dos cadenas alfa antiparalelas que forman una hendidura que se asienta encima de una plataforma compuesta por dos cadenas beta antiparalelas. La hendidura es estrecha y profunda y acepta solamente residuos hidrófobos, considerados de manera clásica que son únicamente lípidos.

60 La hendidura puede albergar una secuencia de 7 aminoácidos caracterizados como residuo hidrófobo en las posiciones (P)1 y 7, y un residuo alifático en P4. P1 es un residuo hidrófobo de manera obligatoria, tal como F, W, H o Y. Sin embargo, P7 es permisivo y puede contener residuos alternativos siempre que no sean polares. Los residuos en P4 son preferiblemente alifáticos pero esto es opcional. Una secuencia general para un motivo de unión

a CD1d es, por tanto, [FWTHY]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-[ILMV]-X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>-[FWTHY]. Sin embargo, debe quedar claro para los expertos en la técnica que el motivo es simétrico y que P7 puede considerarse como P1, y P1 puede considerarse como P7. Los péptidos y polipéptidos de la invención se definen además según su capacidad para activar linfocitos T citolíticos naturales mediante presentación en la molécula CD1d.

5 Muchos péptidos o polipéptidos no portan de manera natural un motivo de unión a CD1d. Sin embargo, la presente invención también cubre péptidos o polipéptidos que ya portan al menos un motivo de CD1d en su secuencia natural, ya que puede encontrarse que resulta ventajoso aumentar el número de dichos motivos para aumentar la supresión de infecciones con patógenos intracelulares o células tumorales, o para aumentar la inmunogenicidad frente a antígenos de agentes infecciosos o de alérgenos.

10 La presente invención se refiere a la producción de péptidos o polipéptidos que se modifican mediante la generación de al menos un nuevo motivo de unión a CD1d dentro de la secuencia natural de dichos péptidos o polipéptidos, o mediante la adición de al menos un motivo de unión a CD1d a dicho péptido o polipéptido, independientemente del hecho de que ya porten un motivo de este tipo.

15 En un aspecto adicional, la invención también cubre el uso de al menos un péptido o polipéptido hidrófobo aislado que comprende al menos un motivo de unión a CD1d representado por el motivo de secuencia general [FW]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-[ILMV]-X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>-[FWTHY] para aumentar en un sujeto la eliminación de células infectadas con patógenos intracelulares o células tumorales, o para aumentar en dicho sujeto la inmunogenicidad de antígenos o alérgenos infecciosos usados para vacunación.

20 En aún un aspecto adicional, la invención también cubre el uso de al menos un péptido o polipéptido aislado en el que se ha generado al menos un motivo de unión a CD1d representado por la secuencia [FW]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-[ILMV]-X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>-[FWTHY] dentro de la secuencia natural de dicho péptido o polipéptido, o se ha añadido a dicha secuencia natural para activar en un sujeto linfocitos T citolíticos naturales.

25 En aún un aspecto adicional, la invención también cubre el uso de al menos un péptido o polipéptido hidrófobo aislado que comprende al menos un nuevo motivo de unión a CD1d representado por la secuencia [FW]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-[ILMV]-X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>-[FWTHY] como medicamento para suprimir en un sujeto la infección con patógenos intracelulares o células tumorales, o para aumentar la eficiencia de antígenos de agentes infecciosos o de alérgenos para vacunación.

30 Una ventaja adicional de la presente invención es que la adición de residuos de aminoácido aromáticos en péptidos o polipéptidos crea motivos de unión a CD1d que son promiscuos en el sentido de que dichos motivos pueden unirse a moléculas CD1d de todos o de una mayoría muy grande de sujetos. Esto se debe al hecho de que la propia molécula CD1d presenta un grado muy limitado de polimorfismo. Como además el polimorfismo, del receptor antigénico de linfocitos T citolíticos naturales está sumamente restringido, debe ser obvio para el experto en la técnica que la misma adición de aminoácidos aromáticos es aplicable a todos los sujetos considerados para la aplicación de la presente invención.

35 Esto contrasta claramente con motivos de péptido o polipéptido que se unen a moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, en los que puede perfilarse un gran número de péptidos que contienen la secuencia apropiada. Esto se debe a las mínimas restricciones impuestas a los péptidos de unión a CMH de clase II y al gran polimorfismo de las moléculas de clase II.

Se obtienen péptidos y polipéptidos que son el objeto de la presente invención de la siguiente manera:

50 (1) se evalúa un péptido o polipéptido por su capacidad para activar linfocitos T citolíticos naturales. Esto se lleva a cabo opcionalmente incubando dicho péptido o polipéptido con una línea celular que expresa la molécula CD1d. Se conocen en la técnica ejemplos de tales líneas celulares (por ejemplo, células JAWS2). En una realización preferida, la línea celular no presenta moléculas de CMH de clase II y se transduce para la hiperexpresión de CD1d usando un vector viral que contiene la secuencia de ADN de CD1d o cualquier otros medios conocidos en la técnica para introducir un gen en una célula. Se conocen métodos para la transducción celular en la técnica. Se carga la línea celular en cultivo con el péptido o polipéptido. Entonces se evalúa la presentación eficiente del péptido o polipéptido por la molécula CD1d midiendo la activación de linfocitos T citolíticos naturales. Tales células pueden obtenerse de sangre periférica mediante, por ejemplo, clasificación magnética y se mantienen en cultivo con estimulantes tales como alfa-gal-ceramida, en presencia de citocinas tales como IL-2 e IL-15 o IL-7. Se describen estos métodos en la técnica (véase, por ejemplo, Brutkiewicz Journal of Immunology 2006, 177: 769-775). Se evalúa la activación de linfocitos T citolíticos naturales usando métodos tales como la evaluación de la producción de citocinas. Se seleccionan los péptidos o polipéptidos que no muestran activación o sólo una activación limitada de linfocitos T citolíticos naturales.

60 (2) también se evalúa la secuencia de aminoácidos del péptido o polipéptido para detectar la presencia de al menos un motivo correspondiente a la secuencia [FWHY]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-[ILMV] o [ILMV]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-[FWHY] (supuesto motivo de unión a CD1d) usando algoritmos bien conocidos en la técnica tales como Prosite en el sitio web de Expasy.

Más particularmente, dichos algoritmos permiten la predicción dentro de un péptido o polipéptido de una o más secuencias de 7 aminoácidos de largo que corresponden a la secuencia [FWHY]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-[ILMV]-X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>-[FWHY] y de ese modo tiene el potencial de encajar la hendidura de una molécula CD1d. Más particularmente, dichos algoritmos permiten la predicción de secuencias de aminoácidos correspondientes a [FW]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-[ILMV] o a [ILMV]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-[FW].

(3) se examinan las secuencias de aminoácidos identificadas por dicho algoritmos y se modifican mediante sustitución de aminoácidos para aumentar el potencial para unirse a CD1d. Esto incluye esencialmente la sustitución de aminoácidos en la posición P1 por un residuo hidrófobo tal como F, W, H o Y y/o la sustitución de aminoácidos en la posición P7 por F, W, T, H o Y, cuando se requiera.

(4) opcionalmente, se identifica un supuesto motivo de unión a CD1d que corresponde a [FWHY]-X<sub>2</sub>-[ILMV] o [ILMV]-X<sub>2</sub>-[FWHY], o [FWHY]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-[ILMV] o [ILMV]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-[FWHY]. En tales casos, se encuentra que la adición de un X<sub>3</sub> o la delección de X<sub>4</sub>, respectivamente, es una ventaja para reconstituir un motivo de unión a CD1d que comprende un residuo de aminoácido alifático en la posición P4. Más generalmente, el supuesto motivo de unión a CD1d podría corresponder a la fórmula general [FWHY]-R-[ILMV] o [ILMV]-R-[FWHY] en los que R representa un aminoácido o una secuencia de aminoácidos.

(5) opcionalmente, puede añadirse un motivo de CD1d a la secuencia de aminoácidos del péptido o polipéptido, o bien en el extremo carboxi-terminal o bien en el amino-terminal de la secuencia, o en cualquier lugar dentro de la secuencia natural del péptido o polipéptido

(6) opcionalmente, pueden modificarse péptidos o polipéptidos de la invención mediante la generación de al menos un motivo de CD1d y mediante la adición de al menos un motivo de unión a CD1d.

(7) opcionalmente, se somete a prueba *in vitro* el péptido sintético que engloba la secuencia que contiene un motivo de unión a CD1d usando una línea celular que expresa la molécula CD1d tal como se describe en (1).

(8) opcionalmente, se somete a prueba *in vitro* la capacidad del péptido o polipéptido modificado mediante la sustitución, adición o delección de aminoácidos tal como se describió anteriormente para unirse a CD1d usando tetrámeros de la molécula CD1d para detectar linfocitos T citolíticos naturales específicos para tal péptido. Una posibilidad es usar tetrámeros marcados de manera fluorescente y detección usando clasificación de células activada por fluorescencia (FACS).

Debe quedar claro para el experto en la técnica que la sustitución o adición de residuos de aminoácido, o la adición de motivo(s) de unión a CD1d puede llevarse a cabo usando un residuo de aminoácido no fisiológico tal como D-aminoácidos o un compuesto orgánico.

El péptido o polipéptido que contiene la sustitución, adición o delección de aminoácidos se produce entonces usando métodos conocidos en la técnica para la producción de proteínas recombinantes usando sistemas de expresión tales como células bacterianas, células de levadura, células de insecto, células vegetales o células de mamífero.

Según la presente invención, se prevén medicamentos para el tratamiento de enfermedades debidas a patógenos intracelulares. Los ejemplos de dichos patógenos intracelulares incluyen virus de ADNmc, ADNbc y ARN, bacterias y micobacterias, y parásitos.

También se prevén medicamentos para el tratamiento de tumores.

Además, también se prevén medicamentos para estrategias de vacunación frente a agentes infecciosos con un ciclo de vida principalmente extracelular y frente a alérgenos.

Debe entenderse que cualquiera de los péptidos o polipéptidos previstos en el contexto de la presente invención puede administrarse en forma de gen para transgénesis, que puede llevarse a cabo usando vectores virales u otros medios conocidos por los expertos en la técnica. En tal caso, puede encontrarse ventajoso alterar la secuencia de aminoácidos del propio vector viral mediante la adición de un motivo de unión a CD1d, aumentando de ese modo la expresión del transgén.

En una realización preferida, el péptido puede estar constituido por un motivo de unión a CD1d que engloba la secuencia [FW]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-[ILMV]-X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>-[FWTHY]. Aún en una realización más preferida, dicho péptido también contiene residuos de aminoácido flanqueantes o bien en el extremo amino-terminal o bien en el carboxi-terminal, o ambos extremos de dicho péptido. En aún una realización preferida, dicho péptido contiene residuos de aminoácido voluminosos en residuos flanqueantes. En aún otra realización, dicho péptido porta al menos un epítipo de célula T restringido a clase II. En aún otra realización, dicho péptido contiene residuos de aminoácido flanqueantes que forman parte de la secuencia natural de la que se deriva el péptido.

El medicamento de la invención es habitualmente, aunque no de forma necesaria, una formulación (farmacéutica)



que comprende como principio activo al menos uno de los péptidos o polipéptidos de la invención o un vector terapéutico génico que puede expresar dichos péptidos o polipéptidos. Aparte del/de los principio(s) activo(s), tal formulación comprenderá al menos uno de un diluyente (farmacéuticamente aceptable).

5 En general, la administración de péptidos o polipéptidos de la invención aumenta la activación del sistema inmunitario innato, más particularmente la activación de linfocitos T citolíticos naturales, más particularmente la producción de citocinas asociadas con la activación de linfocitos T citolíticos naturales, más particularmente las propiedades citolíticas de los linfocitos T citolíticos naturales.

10 La vía de administración para los péptidos o polipéptidos de la presente invención puede variar según la indicación y/o la naturaleza de los péptidos o polipéptidos. Ejemplos son inyección subcutánea o intramuscular de vacunas para una enfermedad infecciosa y para alérgenos o para tumores, o administración oral, nasal o intratraqueal para infecciones con patógenos intracelulares. La presente invención pretende cubrir todas las demás vías de administración posibles tal como intranasal, sublingual, percutánea, intramuscular, intrarrectal o intravaginal.

15 Tal como se explica en detalle más adelante, los péptidos o polipéptidos de la presente invención pueden producirse mediante síntesis química, que permite la incorporación de aminoácidos no naturales.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a métodos para obtener péptidos o polipéptidos que comprenden una secuencia artificial que puede activar linfocitos T citolíticos naturales, comprendiendo dicho método las etapas de:

25 (a) identificar péptidos o polipéptidos que no activan, o sólo lo hacen en un grado limitado, linfocitos T citolíticos naturales;

(b) introducir al menos un motivo de unión a CD1d mediante adición, sustitución y/o delección de aminoácidos.

30 Tales métodos incluyen la identificación de epítomos que pueden modificarse para portar un motivo de unión a CD1d mediante la sustitución, adición o delección de aminoácidos. En la técnica se conocen ampliamente métodos para la identificación *in silico* de supuestos epítomos de linfocitos T citolíticos naturales y algunos aspectos se elaboran a partir de los mismos a continuación en el presente documento.

35 Por ejemplo, cuando se identifica dicho supuesto epítomo de linfocitos T citolíticos naturales, se producen péptidos sintéticos que engloban dicha secuencia. También se sintetizan péptidos alternativos que incluyen la sustitución, adición o delección de aminoácidos que se considera apropiada para aumentar la capacidad de la secuencia de aminoácidos para unirse a CD1d. El péptido que engloba la secuencia natural y péptidos con sustitución/sustituciones, adiciones, delecciones de aminoácidos o combinaciones de estos se someten a prueba para determinar su capacidad para unirse a tetrámeros de CD1d y/o para activar linfocitos T citolíticos naturales mediante la carga de células presentadoras de antígeno que expresan CD1d.

40 Por ejemplo, se obtienen moléculas CD1d solubles y se hace que sean tetraméricas mediante síntesis y/o acoplamiento químico. La molécula CD1d se purifica mediante cromatografía de afinidad. Se incuban las moléculas CD1d solubles con un péptido de referencia marcado con biotina producido según su fuerte afinidad de unión por dicha molécula CD1d. Entonces se incuban los péptidos que van a evaluarse para determinar su unión a CD1d a diferentes concentraciones y se calcula su capacidad para desplazar el péptido de referencia de su unión a CD1d mediante la adición de neutravidina. Pueden encontrarse métodos, por ejemplo, en Texier *et al.*, (2000) *J. Immunology* 164, 3177-3184) para péptidos presentados por la molécula de complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, pero el método puede aplicarse fácilmente a epítomos de célula T restringidos por CD1d.

45 Opcionalmente, puede evaluarse la unión de los péptidos de la invención a tetrámeros de CD1d mediante incubación con linfocitos T citolíticos naturales y análisis mediante clasificación de células activada por fluorescencia (FACS). Estos métodos están bien descritos en la técnica.

50 Alternativamente, se cargan células presentadoras de antígeno tales como células JAWS2 que expresan CD1d pero no expresan complejos mayores de histocompatibilidad de clase II con los péptidos o polipéptidos de la invención y se evalúa su capacidad para activar linfocitos T citolíticos naturales mediante la proliferación de linfocitos T citolíticos naturales tal como se evalúa mediante la incorporación de timidina tritiada. Estos métodos los conoce bien el experto en la técnica. Los péptidos o polipéptidos de la invención tienen un índice de estimulación medio de linfocitos T citolíticos naturales mayor de o igual a 2. Un péptido que tiene un índice de estimulación de linfocitos T citolíticos naturales mayor de o igual a 2 se considera útil como candidato para llevar a cabo la presente invención.

55 Entonces se introduce(n) la(s) sustitución/sustituciones de aminoácidos identificada(s) como adecuada(s) para la presente invención, la adición o delección de dichos aminoácidos en el péptido o polipéptido de longitud completa para poner en práctica la invención.

Los péptidos o polipéptidos de la invención pueden producirse mediante expresión recombinante, por ejemplo, en células bacterianas (por ejemplo, *Escherichia coli*), células de levadura (por ejemplo, de especies de *Pichia*, especies de *Hansenula*, especies de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*), células de insecto (por ejemplo de *Spodoptera frugiperda* o *Trichoplusia ni*), células vegetales o células de mamífero (por ejemplo, células CHO, COS).

5 La construcción de los vectores de expresión adecuados así requeridos (incluyendo información adicional tal como secuencias promotoras y de terminación) implica mientras tanto técnicas de ADN recombinante convencionales. Los péptidos o polipéptidos de la invención producidos de manera recombinante pueden derivarse de una proteína precursora más grande, por ejemplo, mediante escisión enzimática de sitios de escisión enzimática insertados de manera adyacente a los extremos N y/o C-terminal del péptido o polipéptido, seguido por una purificación adecuada.

10 En vista de la longitud limitada de algunos de los péptidos o polipéptidos de la invención, pueden prepararse mediante síntesis peptídica química, en la que se preparan péptidos mediante acoplamiento de los diferentes aminoácidos entre sí. La síntesis química es particularmente adecuada para la inclusión, por ejemplo, de D-aminoácidos, aminoácidos con cadenas laterales que no se producen de manera natural o aminoácidos naturales con cadenas laterales modificadas tales como cisteína metilada. Los métodos de síntesis peptídica química están bien descritos y pueden realizarse pedidos de péptidos de empresas tales como Applied Biosystems y otras empresas. Puede realizarse la síntesis peptídica o bien como síntesis peptídica en fase sólida (SPPS) o bien al contrario como síntesis peptídica en fase de disolución. Los métodos de SPPS mejor conocidos son química en fase sólida con t-Boc y Fmoc que conoce ampliamente el experto. Además, pueden ligarse péptidos entre sí para formar péptidos más largos usando una estrategia de ligamiento (acoplamiento quimioselectivo de dos fragmentos peptídicos no protegidos) tal como describió originariamente Kent (Schnolzer & Kent (1992) Int. J. Pept. Protein Res. 40, 180-193) y se revisó, por ejemplo, en Tam *et al.* (2001) Biopolymers 60, 194-205. Esto proporciona el potencial para lograr la síntesis de proteínas que está más allá del alcance de SPPS. Se han sintetizado de manera satisfactoria muchas proteínas con el tamaño de 100-300 residuos mediante este método.

25 Se examinan las propiedades físicas y químicas de un péptido o polipéptido de interés (por ejemplo solubilidad, estabilidad) para determinar si el péptido es/será adecuado para su uso en composiciones terapéuticas. Normalmente esto se optimiza ajustando la secuencia del péptido. Opcionalmente, el péptido puede modificarse después de la síntesis (modificaciones químicas, por ejemplo, que añaden/delecionan grupos funcionales) usando técnicas conocidas en la técnica.

30 La producción de péptidos o polipéptidos modificados genéticamente se basa en métodos que conocen bien los expertos en la técnica, incluyendo clonación, mutagénesis dirigida al sitio y crecimiento.

35 La presente invención también se refiere a secuencias de ácido nucleico que codifican para los péptidos o polipéptidos de la invención y a métodos para su uso, por ejemplo, para la expresión recombinante o en terapia génica. En particular, dichas secuencias de ácido nucleico pueden expresar péptidos de la invención.

40 En terapia génica, pueden usarse moléculas de ácido nucleico recombinantes que codifican para los péptidos o polipéptidos de la presente invención como ADN desnudo o en liposomas u otros sistemas lipídicos para el suministro a células diana. Otros métodos para la transferencia directa de ADN de plásmido a células los conocen bien los expertos en la técnica para su uso en terapia génica en seres humanos e implican el direccionamiento de ADN a receptores en células mediante complejación del ADN de plásmido con proteínas. En su forma más sencilla, puede realizarse la transferencia génica simplemente inyectando cantidades minúsculas de ADN en el núcleo de una célula, a través de un proceso de microinyección. Una vez que se introducen los genes recombinantes en una célula, pueden reconocerse por los mecanismos normales de las células para la transcripción y traducción, y se expresará un producto génico. También se han intentado otros métodos para introducir ADN en mayores números de células. Estos métodos incluyen: transfección, en el que se precipita ADN con fosfato de calcio y se introduce en células mediante pinocitosis; electroporación, en el que se exponen células a grandes pulsos de tensión para introducir huecos en la membrana); lipofección/fusión liposomal, en el que se empaqueta ADN en vesículas lipófilas que se fusionan con una célula diana; y bombardeo de partículas usando ADN unido a pequeños proyectiles. Otro método para introducir ADN en células es acoplar el ADN a proteínas modificadas químicamente. Las proteínas adenovirales pueden desestabilizar endosomas y potenciar la captación de ADN en las células. El mezclado de adenovirus en disoluciones que contienen complejos de ADN, o la unión de ADN a polilisina unida covalentemente a adenovirus usando agentes de reticulación de proteína mejora sustancialmente la captación y expresión del gen recombinante. Los vectores de virus adenoasociados también pueden usarse para inserción génica en células vasculares. Tal como se usa en el presente documento, "transferencia génica" significa el proceso de introducir una molécula de ácido nucleico foráneo en una célula, lo que se realiza habitualmente para permitir la expresión de un producto particular codificado por el gen. Dicho producto puede incluir una proteína, un polipéptido, ARN o ADN antisentido, o ARN enzimáticamente activo. Puede realizarse la transferencia génica en células en cultivo o mediante administración directa a mamíferos. En otra realización, se proporciona un vector que comprende una secuencia de molécula de ácido nucleico que codifica para un péptido según la invención. En realizaciones particulares, se genera el vector de tal manera que la secuencia de la molécula de ácido nucleico se expresa solamente en un tejido específico. Se conocen bien en la técnica métodos para lograr la expresión génica específica de tejido, por ejemplo, colocando la secuencia que codifica para un péptido inmunogénico de la invención bajo el control de un promotor, que dirige la expresión del péptido específicamente en uno o más tejido(s) u órgano(s).

Pueden usarse vectores de expresión derivados de virus tales como retrovirus, virus vaccinia, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes, virus de ARN o virus del papiloma bovino, para el suministro de secuencias de nucleótidos (por ejemplo, ADNc) que codifican para péptidos, homólogos o derivados de los mismos según la invención en la población celular o los tejidos seleccionados como diana. Pueden usarse métodos que conocen bien los expertos en la técnica para construir vectores virales recombinantes que contienen tales secuencias codificantes. Alternativamente, pueden usarse en terapia génica células modificadas por ingeniería que contienen una molécula de ácido nucleico que codifica para un péptido o polipéptido según la invención.

El medicamento de la invención es habitualmente, pero no de forma necesaria, una formulación (farmacéutica) que comprende como principio activo al menos uno de los péptidos o polipéptidos de la invención, un vector terapéutico génico que puede expresar dicho péptido o polipéptido. Aparte del/de los principio(s) activo(s), tal formulación comprenderá al menos uno de un diluyente (farmacéuticamente aceptable). Normalmente, pueden encontrarse compuestos farmacéuticamente aceptables en, por ejemplo, un manual de la Farmacopea (por ejemplo, la Farmacopea de los EE.UU., Europea o Internacional). El medicamento o la composición farmacéutica de la invención comprende normalmente una cantidad (profiláctica o terapéuticamente) eficaz del/de los principio(s) activo(s) en el que la eficacia es con relación al estado o trastorno que va a prevenirse o tratarse.

Puede ser necesario administrar el medicamento o la composición farmacéutica de la invención a un sujeto como parte de un régimen profiláctico o terapéutico que comprende múltiples administraciones de dicho medicamento o composición. Dichas múltiples administraciones se producen habitualmente de manera secuencial y el intervalo de tiempo entre dos administraciones puede variar y se ajustará a la naturaleza del principio activo y la naturaleza del estado que va a prevenirse o tratarse. La cantidad de principio activo administrada a un sujeto que necesita una única administración también puede variar y dependerá de factores tales como el estado físico del sujeto (como por ejemplo peso y edad), el estatus del estado que va a prevenirse o tratarse, y la experiencia del doctor, médico o enfermero que le trate.

El término "diluyentes" se refiere por ejemplo a soluciones salinas fisiológicas. El término "portador farmacéuticamente aceptable" significa cualquier material o sustancia con el que se formula el principio activo para facilitar su aplicación o diseminación en el locus que va a tratarse, por ejemplo mediante disolución, dispersión o difusión de dicha composición, y/o para facilitar su almacenamiento, transporte o manipulación sin afectar a su eficacia. Incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo, fenol, ácido sórbico, clorobutanol), agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro de sodio) y similares. Pueden incluirse componentes adicionales para controlar la duración de acción del principio activo en la composición. El portador farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido o un líquido o un gas que se ha comprimido para formar un líquido, es decir las composiciones de esta invención pueden usarse de manera adecuada como concentrados, emulsiones, disoluciones, granulados, granulosos, polvos finos, pulverizaciones, aerosoles, suspensiones, pomadas, cremas, comprimidos, microgránulos o polvos.

Los expertos en la técnica conocen bien portadores farmacéuticos adecuados para su uso en dichas composiciones farmacéuticas y su formulación, y no existe ninguna restricción particular en cuanto a su selección dentro de la presente invención. También pueden incluir aditivos tales como agentes humectantes, agentes dispersantes, agentes adherentes, adhesivos, agentes emulsionantes, disolventes, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo fenol, ácido sórbico, clorobutanol), agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro de sodio) y similares, siempre que los mismos sean acordes a la práctica farmacéutica, es decir portadores y aditivos que no creen daño permanente a los mamíferos. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden prepararse de cualquier manera conocida, por ejemplo mediante mezclado de manera homogénea, recubrimiento y/o molienda de los principios activos, en un procedimiento en una sola etapa o múltiples etapas, con el material portador seleccionado y, cuando sea apropiado, los otros aditivos tales como agentes tensioactivos. También pueden prepararse mediante micronización, por ejemplo con vistas a obtenerlos en forma de microesferas que tienen habitualmente un diámetro de aproximadamente 1 a 10  $\mu\text{m}$ , concretamente para la fabricación de microcápsulas para la liberación controlada o sostenida de los principios activos.

Pueden administrarse péptidos o polipéptidos, homólogos o derivados de los mismos según la invención (y sus sales fisiológicamente aceptables o composiciones farmacéuticas todas incluidas en el término "principios activos") por cualquier vía apropiada para el estado que va a prevenirse o tratarse y apropiada para los compuestos, en este caso el péptido o polipéptido que va a administrarse. Las posibles vías incluyen regional, sistémica, oral (forma sólida o inhalación), rectal, nasal, tópica (incluyendo ocular, bucal y sublingual), vaginal y parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intraarterial, intratecal y epidural). La vía de administración preferida puede variar, por ejemplo, con el estado del receptor o el estado que va a prevenirse o tratarse.

Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Pueden presentarse formulaciones de la presente invención adecuadas para administración oral como unidades diferenciadas tales como cápsulas, sellos o comprimidos que contienen cada uno una cantidad predeterminada del principio activo; como polvo o gránulos; como disolución o suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El principio activo también puede presentarse como

bolo, electuario o pasta. Puede producirse un comprimido mediante moldeo o compresión, opcionalmente con uno o más componentes auxiliares. Pueden prepararse comprimidos sometidos a compresión mediante la compresión en una máquina adecuada del principio activo en una forma fluida tal como un polvo o gránulos, mezclado opcionalmente con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, agente tensioactivo o dispersante.

5 Pueden producirse comprimidos moldeados mediante el moldeo en una máquina adecuada de una mezcla del compuesto pulverizado humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden recubrirse o ranurarse opcionalmente y pueden formularse para proporcionar la liberación lenta o controlada del principio activo en los mismos.

10 La presente invención se ilustrará ahora por medio de los siguientes ejemplos, que se proporcionan sin ninguna intención limitativa. Además, todas las referencias en el presente documento están incluidas explícitamente en el presente documento mediante referencia.

### 15 Ejemplos

#### 20 Ejemplo 1. Micobacterias

*Mycobacterium tuberculosis* es responsable de miles de fallecimientos cada año. La única vacunación disponible, la vacuna basada en *Mycobacterium bovis* Calmette-Guerin (BCG), no es eficaz. Un candidato para mejorar la vacunación es la diana de antígeno secretor temprano de 6 kDa (ESAT-6) producido por *M. tuberculosis*, que es uno de los principales antígenos reconocidos tanto por seres humanos como por animales tales como ratones.

Se analizó la secuencia de ESAT-6 (SEQ ID1) usando algoritmos informáticos para identificar motivos de unión a CD1d correspondientes a la secuencia [FW]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-[ILMV]-X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>-[FWTHY]. No se encontró ninguno de tales motivos.

25 Se introdujo una mutación A a F y G a F mediante métodos de mutagénesis convencionales en las posiciones 14 y 20, respectivamente, lo que generó un motivo de unión a CD1d susceptible de activar linfocitos T citolíticos naturales (ESAT-6 mutado; SEQ ID2).

30 Se inmunizaron ratones C57BL/6 con ESAT-6 (SEQ ID1) o ESAT-6 mutado de SEQ ID NO:2 junto con un adyuvante tal como alumbre. Se realizan cuatro inyecciones de 50 µg del péptido a intervalos quincenales. Dos semanas después de la última inmunización, se sacrifican los ratones y se preparan linfocitos T CD4+ a partir del bazo mediante una combinación de centrifugación con gradiente de densidad y selección con perlas magnéticas recubiertas de anticuerpo.

35 Se activan entonces células T CD4+ y se expanden *in vitro* usando células JAWS2 como células presentadoras de antígeno cargadas con ESAT-6 mutado de SEQ ID2. Las células JAWS2 no expresan determinantes de complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, impidiendo de ese modo la activación de células T CD4+ restringidas a clase II, pero las células JAWS2 expresan CD1d y, por tanto, pueden usarse para someter a ensayo la capacidad de péptidos para activar linfocitos T citolíticos naturales. Se observa que solamente se activan los linfocitos T citolíticos naturales obtenidos de ratones inmunizados con el ESAT-6 mutado (SEQ ID2) por las células JAWS2 cargadas,

40 mientras que no se activan los linfocitos T citolíticos naturales de ratones inmunizados con ESAT-6 (SEQ ID1).

Para evaluar las propiedades citolíticas de linfocitos T citolíticos naturales CD4+ activados por ESAT-6 mutado de SEQ ID2, se analizaron células JAWS2 después de 18 h de incubación con linfocitos T citolíticos naturales para la inducción de apoptosis. Por tanto, se detecta la unión de anexina V a la superficie de células apoptóticas mediante la adición de una anexina V marcada de manera fluorescente. Los resultados indican que las células JAWS2 incubadas con linfocitos T citolíticos naturales obtenidos de ratones inmunizados con ESAT-6 mutado (SEQ ID2) se inducen a apoptosis.

50 Estos resultados muestran, por tanto, que las sustituciones de un solo aminoácido que generan un motivo de unión a CD1d son suficientes para estimular la activación de linfocitos T citolíticos naturales y la apoptosis de células presentadoras de antígeno.

#### 55 Ejemplo 2. Tumor EG7

Se derivan células tumorales EG7 (H-2b) de un timoma transducido con un constructo que contiene ovoalbúmina (ova). Se presenta un epítipo de ova restringido por CD1d por tales células, pero se sabe que esto es insuficiente para desencadenar la de activación de NKT y la destrucción de células tumorales (Castano *et al*, Science 1995, 269: 223-226).

60 Se realizó una búsqueda usando algoritmos informáticos para detectar epítopos alternativos que podrían alterarse mediante la sustitución de aminoácidos para generar nuevos motivos de unión a CD1d. Se identificaron dos secuencias en las posiciones 16-22 (FKELKVH) y 181-187 (FKGLWEK). H22 y K187 se mutaron a F en la secuencia de ova generando de ese modo una proteína de SEQ ID4.

65 Se llevó a cabo la inmunización de ratones con ova de SEQ ID4 usando 50 µg de ova en alumbre administrado por

vía subcutánea en 4 ocasiones separadas por un intervalo de 10 días. Se inmunizó un grupo de control con ova en la secuencia natural (SEQ ID3). Entonces se les injertaron a cada ratón  $10^6$  células tumorales EG7 inyectadas en el costado y se siguió a lo largo del tiempo el crecimiento del tumor. Los ratones preinmunizados con ova de SEQ ID4 rechazaron el tumor mientras que no lo hicieron los ratones de control preinmunizados con ova en SEQ ID3 natural.

Se evaluó la destrucción *in vitro* de células EG7 usando linfocitos T citolíticos naturales preparados a partir del bazo usando clasificación con perlas magnéticas. Se estimularon en primer lugar los linfocitos T citolíticos naturales durante 4 h *in vitro* con células presentadoras de antígeno cargadas con ova de SEQ ID4. Se marcaron las células EG7 a nivel de membrana con DiOC<sub>18</sub> 1  $\mu$ M (perclorato de 3,3'-diocetadecicloxacarboianina de Invitrogen). Entonces se cultivaron las células EG7 ( $1 \times 10^5$  por pocillo) durante 18 h a 37°C en presencia de linfocitos T citolíticos naturales obtenidos de cada uno de los 2 grupos de ratones, usando razones de 1/1 a 1/5 (células EG7 frente a linfocitos T citolíticos naturales). Después de 18 h, se recogieron células y se tiñeron para anexina V y 7-AAD siguiendo las instrucciones del fabricante (kit de detección de apoptosis; BD Biosciences) y se analizaron en un citómetro de flujo FACSCantoll (BD Biosciences). Los resultados muestran que las células EG7 incubadas con linfocitos T citolíticos naturales obtenidos de ratones inmunizados con ova de SEQ ID4 se inducen a apoptosis, mientras que los linfocitos T citolíticos naturales obtenidos de ratones de control inmunizados con ova de SEQ ID3 no indujeron un grado significativo de apoptosis de células tumorales.

### Ejemplo 3. Influenza

La hemaglutinina de virus influenza es un importante antígeno usado para fines de vacunación. Sin embargo, la eficacia de vacunación está limitada por la inmunogenicidad relativamente débil de la hemaglutinina.

La secuencia de hemaglutinina (SEQ ID5) contiene 3 secuencias que son adecuadas para mutación para obtener secuencias de aminoácidos que codifican para un motivo de unión a CD1d del formato [FW]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>[ILMV]-X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>-[FWTHY]. Se obtuvo ADNc de hemaglutinina y se introdujeron 3 mutaciones mediante métodos de mutagénesis convencionales para reemplazar el aminoácido en la posición 7 del motivo de unión a CD1d a F (fenilalanina). Estas mutaciones correspondían a V314F, A348F y K459F, en las que se mutaron valina, alanina y lisina en las posiciones 314, 348 y 459, respectivamente, a fenilalanina. La hemaglutinina mutada de SEQ ID6 se produjo mediante tecnología recombinante.

Se inmunizaron los ratones 4 veces o bien con hemaglutinina de SEQ ID5 o SEQ ID6 mediante la vía subcutánea a intervalos de 1 semana. Siete días después de la última inmunización, se sacrificaron los ratones y se prepararon células T CD4<sup>+</sup> a partir de bazo usando clasificación con perlas magnéticas. Se cargaron células JAWS2 con hemaglutinina mutada de SEQ ID6 mediante incubación durante 18 h a temperatura ambiente. Entonces se lavaron las células y se incubaron en presencia de células T CD4<sup>+</sup> obtenidas de ratones inmunizados o bien con hemaglutinina de SEQ ID5 o bien con hemaglutinina de SEQ ID6. Se observa que una proporción significativa de linfocitos T citolíticos naturales se activan cuando se obtienen de ratones inmunizados con hemaglutinina de SEQ ID6 pero no con hemaglutinina de SEQ ID5, demostrando que la inmunización con hemaglutinina de SEQ ID6 había inducido una expansión de linfocitos T citolíticos naturales *in vivo*.

Además, se usa hemaglutinina mutada de SEQ ID6 para vacunación. Se observa que los ratones inmunizados con hemaglutinina de SEQ ID6 producen mayores concentraciones de anticuerpos específicos de hemaglutinina.

### Ejemplo 4. Alérgeno

La vacunación para enfermedades alérgicas está limitada actualmente por la inmunogenicidad relativamente débil de los alérgenos. Se desean enormemente métodos mediante los que pudiera obtenerse una producción aumentada de anticuerpos IgG específicos de alérgeno.

Der p 2 es uno de los importantes alérgenos del ácaro doméstico, *D. pteronyssinus*, asociado con rinitis alérgica y asma en todo el mundo. Una búsqueda dentro de la secuencia de Der p 2 usando algoritmos informáticos no identificó ninguna secuencia que portara un motivo de unión a CD1d. Se añadió un motivo compuesto por 7 aminoácidos (FAALAAF) en el extremo carboxi-terminal de la secuencia de Der p 2. Tal secuencia codifica para un motivo de unión a CD1d correspondiente a la secuencia [FW]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-[ILMV]-X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>-[FWTHY].

Ha de observarse que se sabe que un importante epítipo de célula T presentado por complejos mayores de histocompatibilidad de clase II está ubicado en las posiciones 24-35 de la molécula de Der p 2 madura.

Se inmunizaron dos grupos de ratones C57BL/6 (H-2b) o bien con Der p 2 nativo (SEQ ID7) o bien con Der p 2 nativo en el que se había añadido un motivo de unión a CD1d (SEQ ID8), usando 50  $\mu$ g de proteína en alumbre inyectados por vía subcutánea 4 veces a intervalos de 10 días. Se extrajo entonces sangre a los ratones y se sometió a prueba la concentración de anticuerpos anti-Der p 2 específicos mediante ELISA de unión directa. Se observa que la concentración de anticuerpos es 10 veces mayor en el grupo de ratones inmunizados con Der p 2 de SEQ ID8.

Además, se prepararon células T CD4+ a partir del bazo de cada ratón de los 2 grupos, usando clasificación con perlas magnéticas. Se cultivaron tales células ( $10^6$  células/pocillo) con células dendríticas preparadas a partir de ratones CD1d KO singénicos. Tales células solamente pueden activar células T CD4+ restringidas a clase II. Se observa que las células obtenidas de ratones inmunizados con Der p 2 de SEQ ID8 proliferan con un índice de estimulación 4 veces mayor que las células obtenidas de ratones inmunizados con Der p 2 nativo (SEQ ID7).

Por tanto, se concluye que la presencia de un motivo de unión a CD1d aumenta la producción de anticuerpos específicos y la proliferación de células T CD4+ restringidas a clase II.

Debe entenderse que los ejemplos proporcionados en el presente documento no son exhaustivos y que se prevén combinaciones de proteínas o péptidos que contienen diversos números de sustituciones o deleciones de aminoácidos para generar nuevos motivos de unión a CD1d o que contienen diversos números de motivos de unión a CD1d añadidos dentro del alcance de la presente invención.

**15 Listas de secuencias**

SEQ ID1 ESAT-6 (micobacterias)

1 mteqqwnfag ieaasaiqg nvtsihslld egkqsltkla aawggsgsea yqgvqqkwa  
61 tatlennalq nartiscag qamastegnv tgmfa

SEQ ID2 ESAT-6 mutado (mutaciones subrayadas)

1 mteqqwnfag ieaFasaiqF nvtsihslld egkqsltkla aawggsgsea yqgvqqkwa  
61 tatlennalq nartiscag qamastegnv tgmfa

SEQ ID3 ovoalbúmina (gallina)

1 mgsigaasme fcfdvfelk vghanenify cpiaimsala mvylgakdst rtqinkvrf  
61 dklpgfgdsi eaqcgtsvnn hsslrldilnq itkndvysf slasryace rypilpeylq  
121 cvkelyrggl epinfqtaad qarelinswv esqtngiirm vlqpsvdsq tamvlvnaiv  
181 fkgfwekftk dedtqampfr vteqeskpqv mmyqiglfrv asmasekmki lelpfasgtm  
241 smlvllpdev sgleqlesii nfekltewts snvmeerkik vylprmkmee kynltsvlma  
301 mgitdvfsss anlgissae slkisqueavha ahacineagr evvgsacagv daasvseevr  
361 adhpflfcik hiatnavlff grcvsp

SEQ ID4 ovoalbúmina mutada (mutaciones subrayadas)

1 mgsigaasme fcfdvfelk vFghanenify cpiaimsala mvylgakdst rtqinkvrf  
61 dklpgfgdsi eaqcgtsvnn hsslrldilnq itkndvysf slasryace rypilpeylq  
121 cvkelyrggl epinfqtaad qarelinswv esqtngiirm vlqpsvdsq tamvlvnaiv  
181 fkgfweFtk dedtqampfr vteqeskpqv mmyqiglfrv asmasekmki lelpfasgtm  
241 smlvllpdev sgleqlesii nfekltewts snvmeerkik vylprmkmee kynltsvlma  
301 mgitdvfsss anlgissae slkisqueavha ahacineagr evvgsacagv daasvseevr  
361 adhpflfcik hiatnavlff grcvsp

SEQ ID5 hemaglutinina de influenza A (virus)

1 mkakllvllc alaadtadti cigyhannst dtvdtllekn vtvtshvnl edshngklek  
61 lkgiaplqlg kniagwllg npecdslpa rswsyivetp nsengacypg dfidyeelke  
121 qlssvssler feifpkessw pnhtkgvta scshggkssf ymlwlwtk edsyplksn

181 yvnnkgevl vlvghhps sdeqqslh vnaysvsvss nyngrftpei aarpkvrnqh  
241 grmnywtll epgdtiifea tgnliapwya falsrgfgsg iitsnasmhe cntkcqtpqg  
301 ainsslpfqh ihpvtigeep kyvrstklrm vtglmipsi qfrglfgaia gfieggwtgm  
361 idgwygyhhq neqsggyaad qkstqnaing itnkvnsvie kmntqftavs kefnlekrm  
421 enlnkkvddg fldiwtynae llvllenert ldfhdlnvkn lyekvksqk nmakeingc  
481 fefyhkcdnk cmesvrngty dypkyseesk lnrekidgvk lesmgvyqil aiystvassl  
541 vllvslgais fvmcsngslq crici

SEQ ID6 hemaglutina mutada de influenza A (mutaciones subrayadas)

1 mkakllvllc alaadtadi cigyhannst dtvdtllekn vtvtshvnl edshngklck  
61 lkgiapqlg kcniaqwllg npecdslpa rswsyivetp nsengacypg dfidyeelke  
121 qlssvssler feifpkessw pnhntkgvta scshggkssf ymllwltkt edsyplksns  
181 yvnnkgevl vlvghhps sdeqqslh vnaysvsvss nyngrftpei aarpkvrnqh  
241 grmnywtll epgdtiifea tgnliapwya falsrgfgsg iitsnasmhe cntkcqtpqg  
301 ainsslpfqh ihpFtigeep kyvrstklrm vtglmipsi qfrglfgFia gfieggwtgm  
361 idgwygyhhq neqsggyaad qkstqnaing itnkvnsvie kmntqftavs kefnlekrm  
421 enlnkkvddg fldiwtynae llvllenert ldfhdlnvFn lyekvksqk nmakeingc  
481 fefyhkcdnk cmesvrngty dypkyseesk lnrekidgvk lesmgvyqil aiystvassl  
541 vllvslgais fvmcsngslq crici

5

SEQ ID7 alérgeno Der p 2 (*Pyroglyphidae, Dermatophagoides pteronyssinus*, ácaro doméstico europeo)

1 dqvdvdcan heikkvlvpg chgsepaiih rgkpfqleav feanqnska kieikasidg  
61 levdpvgidp nachymkcp l vkgqqydiky twvvpkiapk senvvvtakv mgddgvlaca  
121 iathakird\*

10

SEQ ID8 alérgeno Der p 2 modificado (motivo de CD1d subrayado)

1 dqvdvdcan heikkvlvpg chgsepaiih rgkpfqleav feanqnska kieikasidg  
61 levdpvgidp nachymkcp l vkgqqydiky twvvpkiapk senvvvtakv mgddgvlaca  
121 iathakird FAALAAF

15

## REIVINDICACIONES

1. Método para obtener un péptido o polipéptido inmunogénico que comprende una secuencia artificial que puede activar linfocitos T citolíticos naturales, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 5 (a) identificar un péptido o polipéptido que no active linfocitos T citolíticos naturales;
- (b) introducir al menos un motivo de unión a CD1d que comprende [FWHY]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-[ILMV]-X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>-[FWHY] mediante adición, sustitución y/o delección de aminoácidos en la secuencia natural de dicho péptido o polipéptido, en la que X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub> representan cualquier aminoácido.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho péptido o polipéptido que no activa linfocitos T citolíticos naturales comprende al menos un supuesto motivo de unión a CD1d elegido de [FWHY]-R-[ILMV] y/o [ILMV]-R-[FWHY] en los que R representa un aminoácido o una secuencia de aminoácidos.
- 15 3. Método según la reivindicación 2, en el que dicho al menos un supuesto motivo de unión a CD1d se elige de la secuencia de aminoácidos [FWHY]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-[ILMV], [ILMV]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-[FWHY], [FWHY]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-[ILMV], [ILMV]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>-[FWHY], [FWHY]-X<sub>2</sub>-[ILMV], [ILMV]-X<sub>2</sub>-[FWHY] o cualquier combinación de las mismas, en las que X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub> representan cualquier aminoácido.
- 20 4. Método según las reivindicaciones 2 a 3, en el que dicho supuesto motivo de unión a CD1d se deriva de un patógeno intracelular, un antígeno asociado a tumor, un antígeno procedente de un agente infeccioso o un alérgeno, en el que dicho patógeno intracelular es un virus de ADNmc, ADNbc y ARN, como ejemplos con los virus *Herpesviridae*, *Flaviviridae* y *Picornaviridae*, influenza, de sarampión y de inmunodeficiencia, en el que dichas bacterias y micobacterias son *Mycobacterium tuberculosis*, otras micobacterias patógenas para seres humanos o animales, *Yersiniosis*, *Brucella*, *Chlamydiae*, *Mycoplasma*, *Rickettsiae*, *Salmonellae* y *Shigellae*, los parásitos son *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Toxoplasma gondii*, *Listeria*, *Histoplasma*, en el que dicho tumor es un oncogén, un protooncogén, una proteína derivada de virus, un factor de supervivencia o un determinante clonotípico, en el que dicho agente infeccioso es un virus, una bacteria o un parásito, en el que dicho alérgeno es un alérgeno de transmisión aérea, alérgeno por contacto, alérgeno sistémico o alérgeno alimentario.
- 25 5. Péptido o polipéptido modificado que puede activar linfocitos T citolíticos naturales que puede obtenerse mediante un método que comprende las etapas de
- 30 (a) identificar un péptido o polipéptido que no active linfocitos T citolíticos naturales;
- (b) introducir al menos un motivo de unión a CD1d mediante adición, sustitución y/o delección de aminoácidos en la secuencia natural de dicho péptido o polipéptido, y en el que dicho motivo de unión a CD1d comprende [FWHY]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-[ILMV]-X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>-[FWHY] representando X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub> cualquier aminoácido,
- 35 siendo dicho péptido o polipéptido modificado para su uso como medicamento para activar en un mamífero linfocitos T citolíticos naturales, procediendo dicho péptido o polipéptido que no activa linfocitos T citolíticos naturales de un patógeno intracelular, un antígeno asociado a tumor, un antígeno procedente de un agente infeccioso o un alérgeno.
- 40 6. Secuencias de ácido nucleico que pueden expresar un péptido o polipéptido modificado que puede activar linfocitos T citolíticos naturales que puede obtenerse mediante un método que comprende las etapas de
- 45 (a) identificar un péptido o polipéptido que no active linfocitos T citolíticos naturales;
- (b) introducir al menos un motivo de unión a CD1d mediante adición, sustitución y/o delección de aminoácidos en la secuencia natural de dicho péptido o polipéptido, y en el que dicho motivo de unión a CD1d comprende [FWHY]-X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-[ILMV]-X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>-[FWHY] representando X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub> cualquier aminoácido,
- 50 procediendo dicho péptido o polipéptido que no activa linfocitos T citolíticos naturales de un patógeno intracelular, un antígeno asociado a tumor, un antígeno procedente de un agente infeccioso o un alérgeno,
- 55 siendo dichas secuencias de ácido nucleico para su uso como medicamento para activar en un mamífero linfocitos T citolíticos naturales.
- 60